

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

## ⑫ 公開特許公報(A)

昭62-142114

⑨ Int.Cl.<sup>4</sup>

A 61 K 31/155

識別記号

AGZ  
ABX  
ADN  
ADP  
ADS

庁内整理番号

7330-4C

⑬ 公開 昭和62年(1987)6月25日

※審査請求 未請求 発明の数 4 (全13頁)

⑭ 発明の名称 蛋白質の老化抑制組成物、その製薬組成物及びこれを用いた蛋白質  
老化抑制方法

⑯ 特 願 昭61-271689

⑰ 出 願 昭61(1986)11月14日

優先権主張 ⑱ 1985年11月14日 ⑲ 米国(US) ⑳ 798032

㉑ 発 明 者 アンソニー セラミ アメリカ合衆国 ニューヨーク州 11964 シェルター  
アイランド ラム アイランド ドライブ (番地なし)  
㉒ 発 明 者 ビーター ウルリヒ アメリカ合衆国 ニューヨーク州 10021 ニューヨーク  
イースト 63番 ストリート 500  
㉓ 出 願 人 ザ ロックフェラー アメリカ合衆国 ニューヨーク州 10021-6399 ニュー  
ユニバーシティ ヨーク ヨーク アベニュー 1230  
㉔ 代 理 人 弁理士 早川 政名

最終頁に続く

## 明 細 書

## 1. 発明の名称

蛋白質の老化抑制組成物、その製薬組成物及  
びこれを用いた蛋白質老化抑制方法

## 2. 特許請求の範囲

1. 標的蛋白質の二次グリコシル化を抑制する  
組成物であって、標的蛋白質の初期グリコシル化  
により生成される初期グリコシル化産物の、カル  
ボニル部分と反応することのできる薬剤を含む組  
成物。

2. 前記薬剤が活性酸素含有置換基を有する化  
合物からなる特許請求の範囲第1項記載の組成物。

3. 前記活性酸素含有置換基がヒドラジン基で  
ある特許請求の範囲第2項記載の組成物。

4. 前記化合物が、アミノ酸、そのエステル及  
びアミド、及びこれらの混合物よりなる群から選  
ばれた材料から少なくとも部分的に誘導されるも  
のである、特許請求の範囲第2項記載の組成物。

5. 前記化合物が、アミノグアニジン、 $\alpha$ -ヒ

ドラジノヒスチジン、リジン、及びこれらの混合  
物よりなる群から選ばれたものである、特許請求  
の範囲第2項記載の組成物。

6. 動物体内の標的蛋白質の二次グリコシル化  
を抑制するため前記動物に投与するための製薬組  
成物であって、前記標的蛋白質の初期グリコシル  
化により生成される初期グリコシル化産物の、カ  
ルボニル部分と反応することのできる薬学的に有  
効量の薬剤、及び薬学的に受け入れられる担体、  
とを含む製薬組成物。

7. 前記薬剤が活性酸素含有置換基を有する化  
合物からなる特許請求の範囲第6項記載の製薬組  
成物。

8. 前記活性酸素含有置換基がヒドラジン基で  
ある特許請求の範囲第7項記載の製薬組成物。

9. 前記化合物が、アミノ酸、そのエステル及  
びアミド、及びこれらの混合物よりなる群から選  
ばれた材料から少なくとも部分的に誘導されるも  
のである、特許請求の範囲第7項記載の製薬組成  
物。

10 前記化合物が、アミノグアニジン、 $\alpha$ -ヒドラジノヒスチジン、リジン、及びこれらの混合物よりなる群から選ばれるものである、特許請求の範囲第7項記載の製薬組成物。

11 標的蛋白質の二次グリコシル化抑制方法であって、標的蛋白質を、その初期グリコシル化により生成される初期グリコシル化産物のカルボニル部分と反応することのできる薬学的に有効量の薬剤と、接触させることを含む方法。

12 前記薬剤が活性酸素含有置換基を有する化合物からなる特許請求の範囲第11項記載の方法。

13 前記活性酸素含有置換基がヒドラジン基である特許請求の範囲第12項記載の方法。

14 前記化合物が、アミノ酸、そのエステル及びアミド、及びこれらの混合物よりなる群から選ばれた材料から少なくとも部分的に誘導されるものである、特許請求の範囲第7項記載の方法。

15 前記化合物が、アミノグアニジン、 $\alpha$ -ヒドラジノヒスチジン、リジン、及びこれらの混合物よりなる群から選ばれるものである、特許請求

の範囲第20項記載の方法。

22 前記活性酸素含有置換基がヒドラジン基である特許請求の範囲第21項記載の方法。

23 前記化合物が、アミノ酸、そのエステル及びアミド、及びこれらの混合物よりなる群から選ばれた材料から少なくとも部分的に誘導されるものである、特許請求の範囲第21項記載の方法。

24 前記化合物が、アミノグアニジン、 $\alpha$ -ヒドラジノヒスチジン、リジン、及びこれらの混合物よりなる群から選ばれるものである、特許請求の範囲第21項記載の方法。

25 前記製薬化合物が経口的に投与される特許請求の範囲第18項記載の方法。

26 前記製薬組成物が局部的に投与される特許請求の範囲第18項記載の方法。

27 前記製薬組成物が経口的に投与される特許請求の範囲第18項記載の方法。

28 前記製薬組成物が定期的に毎日投与される特許請求の範囲第18項記載の方法。

29 前記製薬組成物が、動物体体重1kgあたり

の範囲第11項記載の方法。

16 前記組成物が、前記標的蛋白質の分泌量に導入される特許請求の範囲第11項記載の方法。

17 前記標的蛋白質が食品中にみられ、前記組成物がその食品に適用される特許請求の範囲第11項記載の方法。

18 動物体内の標的蛋白質の二次グリコシル化最終産物の生成を抑制するための動物の治療方法であって、前記標的蛋白質の初期グリコシル化により生成する初期グリコシル化産物のカルボニル部分と反応しうる薬剤を含む製薬組成物の有効量を投与することを含む方法。

19 前記標的蛋白質が、コラーゲン、エラスチンレンズ蛋白質、血管壁、神経蛋白質及び系球体基質膜からなる群が選ばれるものである特許請求の範囲第18項記載の方法。

20 前記製薬組成物が、前記薬剤、及び薬学的に受け入れられる担体、を含む特許請求の範囲第18項記載の方法。

21 前記薬剤が活性酸素含有置換基を有する化

約25mgまでの量で投与される特許請求の範囲第18項記載の方法。

30 前記製薬組成物が炊こうの形に調製され、前記薬剤がその約10重量%までの量である特許請求の範囲第26項記載の方法。

### 3. 発明の詳細な説明

#### 産業上の利用分野

本発明はグルコースの反応により生ずる蛋白質の老化(劣化)に関し、更に詳しくは、蛋白質の非酵素的グリコシル化とそのより進行した二次グリコシル化最終産物に至る次の反応の、抑制、その抑制方法ならびにその薬剤に関わる。

#### 従来の技術

グルコースと蛋白質との反応は知られている。その最初のものは、食品料理中における褐色色素の出現にかかわるものであって、メイラードにより1912年に報告されたものである。メイラードは、グルコースその他の還元糖がアミノ酸と反応して、安定した褐色色素物を生成する一連の脱水及び再縮合反応を行う付加物を生ずることを観察した。

(Maillard, L C 1912 年, C R Acad Science, 154 号, 66-68ページ)。

メイラードによる最初の発見につづき、食品化学者はこの仮説である反応を詳細に研究し、貯蔵され或いは加熱処理を受けた食品はグルコースとポリペプチド類の反応の結果非酵素的に褐色化すること、また蛋白質が結果的に交差結合しそれに対応して生物学的適応性が減することを確かめた (Finot, P A, 1982年, Modifications of Proteins, 編集: Feeney, R E 及び Whitaker, J.R. American Chemical Society 198号, 91-124 ページ, ワシントン特別区)。この時点で、蛋白質グリコシル化の結果として生ずる褐色化に関わる色素は特徴的なスペクトル及び蛍光特性を有することがわかったが、色素の化学構造は特別には解明されなかった。

上述した還元糖と食品蛋白質との反応は、近年、生体内でも行われていることがわかった。即ち、グルコースと蛋白質の遊離アミノ基との非酵素的反応であってアマドリ生成物として知られる安定

したアミノ、1-デオキシケトシル付加物を生成する反応は、ヘモグロビンと共に生ずることがわかり、この際、グルコースとの反応によるヘモグロビンのβ-鎖のアミノ末端基の再構成によってヘモグロビンA<sub>1c</sub>として知られる付加物が生じる。この反応はまた、種々の他の生体蛋白質、例えばレンズ結晶、コラーゲン、神経蛋白質についても生ずることがわかった (Bunn, H. F., Haney, D. H Gobbay, K. H ; 及び Gallop P H による1975年, Biochem. Biophys. Res. Comm. 67 巻, 103-109 ページ; Koenig, R. J., Blobstein, S H; 及び Cerami, A., による1977年, J. Biol. Chem. 252巻, 2992-2997ページ; Honniet, V H 及び Cerami, A. による "Maillard Reaction in Food And Nutrition", Walter, G. A. 編, American Chemical Society, 215巻, 431-448ページ; 及び Honniet, V H 及び Cerami, A による1982年, "Clinics in Endocrinology and Metabolism", 11巻, 431-452ページ, 参照)。更に後期段階メイラード生成物のそれに似たスペクトル及び蛍光特性を有す

る褐色色素もまた、いくつかの長い生命を有する蛋白質、例えば老齢のレンズ蛋白質及びコラーゲンなどの生体内で観察された。年齢にかかわる色素の直線的な増加は、20歳乃至90歳の年齢の人間の硬部のコラーゲン中に観察された (Honniet, V H 及び Cerami, A の1981年, Science, 211巻, 491-493ページ; Honniet, V H 及び Cerami, A の1983年, Biochem. Biophys. Acta, 760 巻, 97-103号; 及び Honniet, V. H.; Kohn, R R 及び Cerami, A の "Accelerated Age-Related Browning of Human Collagen in Diabetes Mellitus", 1984 年, Proc Nat. Acad Sci, 81巻 583-587ページ, 参照)。興味あることは、コラーゲンの老齢化はグルコースにより誘導される交叉結合により生体内で模倣することができることである; またコラーゲンによる付加物の生成は、交叉結合により生ずることが推論され、これらのことは、腎臓基質膜におけるアルブミンと抗体の結合を説明しうると考えられる (Brounlee, M ; Ponger, S 及び Cerami, A による1983年, J Exp Med, 158巻,

1739-1744ページ; Kohn, R R ; Cerami, A. 及び Honniet, V H. による1984年, Diabetes, 33巻, 1号, 57-59ページ参照)。

参考のために言及する親出願の米国特許第 590,820号及び上記の Pongor, S H. ほかの文献においては、蛍光発色団が分離され、ある種の褐色ポリペプチド、例えばウシ血清アルブミン及びポリ-1-リジン中に存在するものであることが同定され、2-フロイル-4(5)-2(フランイル)-1H-イミダゾルの構造を与えられたことが記載されている。この化合物は、互変異性状態で存在していることがわかっており、その構造中に、二つのペプチドに由来するアミン窒素を有する。化合物中にこれらのアミン窒素及び二つのグルコース残基を含むことは、そのペプチド結合ブライサ(前駆体)がメイラード反応の後の段階で観察される、グルコースによる蛋白質の生体内交叉結合と関係していることを示唆している (Chang, J C F ; Ulrich, P. C ; Bucala, R ; 及び Cerami, A, 1985, J Biol Chem 260巻, 7970-7974ペー

ジ参照)。この発色団によって高次のグリコシル化最終産物の同定、蛋白質の老化プロセスを説明するための補足的な研究、及び老化抑制のための方法及び薬剤を開発する努力に関わる特定の化学を設定すること、が可能になった。本出願はこのような目的に向けられるものである。

#### 本発明の要約

本発明によれば、蛋白質老化抑制のための方法及び関連する薬剤が開示される。特に、二次グリコシル化最終産物の生成に基因する蛋白質老化を抑制する薬剤は、グルコースと蛋白質の反応によって生ずる初期グリコシル化産物と反応することのできる物質の中から選ばれる。従って例えばヒドラジン基などの活性基含有置換基を有する化合物或いは組成物が、適当なものであると推論され、例えばアミノグアニジン、 $\alpha$ -ヒドラジノヒスチジン及びリジンなどの化合物が適当なものであることがわかった。これらの薬剤は、初期グリコシル化産物に対しこれら産物の反応性カルボニル基と反応し、それにより、蛋白質交叉結合を誘

導するような後の段階の二次グリコシル化最終産物の生成を妨げる。

本発明はまた、初期グリコシル化産物の段階1における初期グリコシル化蛋白質を、本発明の一種もしくは数種の薬剤のある量と接触させることによる蛋白質劣化抑制方法にもかかわる。本発明方法が産業的用途に向けられる場合、一種もしくは数種の薬剤が、問題となる蛋白質に対し、蛋白質抽出物の場合にはその中に混合する形で、蛋白質を含む食品の場合には食品中と混合或いは適用する形で使用され、いずれにしろ特定食品の早すぎる老化或いは劣化を防止するようにする。

本発明方法が治療目的に使用される場合、治療の対象となる動物に対しては、一種或いは数種の薬剤のある量が適当な製剤の形で投与される。投与は公知の方法、例えば経口的、局所的、或いは非経口的、例えば皮下注射、静脈注射、或いは腹腔内注射、等の方法で行うことができる。薬剤投与量は例えば動物体体重1kgあたり約25gの量を長期間にわたって行う。

この薬剤は、二次グリコシル化最終産物の生成を抑制する能力によって、蛋白質老化が重大な支障を来すあらゆる分野で重要な効果を発揮する。かくして食品業界においては食品劣化を遅らせるため、ある種の食品について劣化しないよう限界にまで安定させかくして消費者により利用しやすい形にすることができ、それにより著しい経済的かつ社会的な貢献をなしうる。同様に蛋白質劣化が問題になっている他の業界では、蛋白質を含む組成物中に本発明薬剤を混和することにより、有効寿命を延長しうる。今日使用されている保存剤及び変色防止剤、例えば二酸化イオンなど動物体にアレルギーやぜん息などの毒性効果を生じせしめる物質に代り本発明に記載される物質を使用することができる。

本発明方法はある種の治療目的にも使用される。なぜならメイラード反応は身体内の蛋白質部分のいくつか、なかでもコラーゲン、エラスチン、レンズ蛋白質及び腎臓の糸球体基質膜にいちじるしい影響を及ぼすからである。これらの蛋白質は老

化(従って“蛋白質老化”の用語を使う)と共に、また糖尿病の余病の一つとして、劣化する。従って、二次グリコシル化最終産物の生成を遅延させるか或いは実質的に抑制することによって、糖尿病の著しく悪い症状を良好に治療することができ、また勿論動物寿命の延長をもたらすことができる。

従って本発明の第一の目的は、蛋白質とグルコースの反応の最終的な結果として生ずる蛋白質の交叉結合を抑制し、二次グリコシル化最終産物の生成を抑制する方法を提供することである。

本発明の別の目的は、上述のような方法であって、初期グリコシル化産物である初期グリコシル化蛋白質との反応を特徴とする方法、を提供することである。

本発明の更に別の目的は、前記二次グリコシル化最終産物を生成するような、初期グリコシル化産物の再構成及び交叉結合を抑制する生成方法を提供することである。

本発明の更に別の目的は、前記方法において、初期グリコシル化産物との反応に関与することの

できる薬剤を提供することである。

本発明の更に別の目的は、蛋白質老化による悪い結果である動物性蛋白質の脆化及び食品の褐変化及び劣化を抑制する方法、を提供することである。

本発明の他の目的及び利点は、添削図面を参照しつつ以下の説明を検討することにより、当業者には明らかであろう。

本発明の詳細な説明（問題点を解決する手段及び作用）

本発明によれば、動物性及び植物性物質中に存在する種々の標的蛋白質中の二次グリコシル化最終産物の生成を抑制すると考えられる組成物及びこれに関連する方法が開発された。特に、本発明によれば、蛋白質の一次グリコシル化により生成される初期グリコシル化産物のカルボニル部分と反応させる一極又は数種の薬剤であって、標的蛋白質中の二次グリコシル化最終産物の生成を抑制することのできる薬剤を含む組成物が提供される。

二次グリコシル化最終産物を生成させる蛋白質

本発明は初期蛋白質グリコシル化の阻止を意図するものではない。なぜなら、グルコースと蛋白質アミノ基との反応を阻止するような薬剤を使用することは殆んど不可能なことであるからである。初期グリコシル化を阻止することのできる薬剤は極めて毒性が高くなりやすく、また初期グリコシル化は約二週間で平衡に達するため、この目的を達するための必要時間は不十分である。これに代り、理想的な薬剤は、老化及び糖尿病に関わる病理学的に直接の原因となる最終的な二次グリコシル化最終産物の生成に至る、長期にわたる後グリコシル化段階を阻止あるいは抑制しうる薬剤である。

従って、本発明に有用な組成物は、初期グリコシル化産物の活性カルボニル中間物と反応することのできる薬剤を含む。適当な薬剤は、活性窒素含有基或いは、例えばヒドラジン基などの置換基を有する化合物である。またこのような薬剤或いは化合物は、アミノ酸（そのエステル及びアミドを含む）から部分的に誘導されるものであっても

のより一層の交叉結合を生じしめ、また皮膚収縮、ある種の腎臓病、アテローム性動脈硬化症、骨関節炎等の生体内条件を生じさせることの明らかなその他の蛋白質の捕集を促す活性位置をもつと考えられているのは、初期グリコシル化産物のカルボニル部分と蛋白質部分との結合部分近くに位置するカルボニル基である。また、非酵素的褐変劣化を生ずる植物性物質は、食品の場合には、褐変劣化が生じると劣化し食用に適さないものとなる。従ってこのカルボニル部分との反応が後期メイラード反応を抑制するものと考えられる。

本発明は、この後期のグリコシル化段階を阻止する薬剤、即ち、その存在が糖尿病及び老化に至るような、先述 Pongor ほかにより固定されたような蛍光発色団の生成を阻止する薬剤を使用することに原理を置く。理想的な薬剤は、このような発色団の生成、及び蛋白質と蛋白質との前記発色団にかかわる交叉結合、及び動脈や腎臓で生ずるような他の蛋白質における蛋白質の捕集、を阻止する薬剤である。

よい。なぜなら、このような誘導体を含む化合物は、接触する標的蛋白質と生物学的に和合性があるものであるからである。例えば、薬剤は、アミノグアニジン、 $\alpha$ -ヒドラジノヒスチジン及びリジンからなる群から選ばれる化合物であってもよく、またこれら薬剤或いは化合物の混合物であってもよい。これら薬剤或いは化合物のそれぞれは、初期グリコシル化産物のカルボニルと反応すると考えられる活性窒素置換基を有する。従って、この薬剤と蛋白質のグリコシルーリジン部分との反応によって、このグリコシルーリジン部分が他の基と交叉結合を生ずることが阻止されよう。

ホリス及びストリックベルガー（"Diabetologia", 28巻、282-285ページ、1985年）は、酵素ヒスチジナカルボキシラーゼの既知抑制剤である化合物 $\alpha$ -ヒドラジノヒドラジンの生体内投与によりラットの大動脈におけるアルブミンの蓄積を減少させることを知った。彼等は、この体系におけるヒスタミンの生産減少作用をする製剤を提案し、かくしてヒスタミンはアテローム性

動脈硬化症にみられる低濃度リポプロテイン蓄積の仲介体であるとした。ホリス及びストリックベルガーの発見は、本発明の概念及びその適用とはいくつかの点で区別することができる。第一の差異は、彼等は、糖尿病にかかった動物に観察される蛋白質蓄積にかかわっており、蛋白質の二次非酵素性グリコシル化にかかわるものでないことである。更に、彼等により示唆されている $\alpha$ -ヒドロラジノヒスチジンによるヒスタミン合成抑制機構は、本発明の基本概念と作用的に区別され、また本発明によれば疑問があるとすら考えられる。

本発明の薬剤は、初期グリコシル化産物のカルボニル部分と反応する能力に基いて同定され試験されたものであり、ホリス及びストリックベルガーの研究には示唆されていないものである。特に、アミノグアニジンはヒスタミンのレベルを増加させることが知られており(Lindberg, S. 及び Tornquist, Aによる“The Inhibitory Effect of Aminoguanidine on Histamine Catabolism in Human Pregnancy”, ACTA OBSTET. GYNECOL.

のであることが理解されるべきである。本発明の薬剤或いは化合物の薬理学的に有効量を、製剤組成物の形に調整することができ、これは、この目的に沿う公知物質の中から選択した薬学的に受け入れられる担体を含む。このような組成物は投与方法に対応して種々の形態に調整される。例えばアミノグアニジンは、相合性を高めまた腹腔内注射の苦痛をより少なくするために、市販されている亜硫酸塩を用いて亜硫酸塩の形を誘導してもよい。また投与方法が静脈内注射或いは腹腔内注射である場合、液体の形にしてもよい。一方経口投与のためには適当な錠剤或いはカプセルとしうる。皮膚に塗布する場合には、皮膚への投入を助長するためのキャリアを用いてローション或いは軟膏の形にする。他の体組織へ投与するため、このほかの適当な方法も考えることができよう。

本発明は更に二次グリコシル化最終産物の生成を抑止する方法に関わり、この方法は、標的蛋白質を本発明組成物と接触させることを含む。標的蛋白質が食品に含まれている場合、食品が植物

SCAND. 45巻, 131-139ページ, 1966年, 参照)、また $\alpha$ -ヒドロラジノヒスチジン及びアミノグアニジンは、従って、ヒスタミンのレベルに対極的な影響を与えるものである。従って本発明は、ホリス及びストリックベルガーにより提案される機構と概念的に異なり、 $\alpha$ -ヒドロラジノヒスチジン及びアミノグアニジンの両方が生体内及び試験管内で蛋白質交叉結合を減少する能力を有するという発見に基づくものであることがわかるであろう。

化合物アミノグアニジンは動物体に対し毒性が低いことが知られている。1978年版化学物質の毒性効果表(1978 Registry of Toxic Effect of Chemical Substances)によれば、アミノグアニジン基体の半致死量は、ラットに皮下注射により1258mg/kg、マウスに963mg/kg投与した場合にみられた。その塩酸誘導体の半致死量は、皮下注射によりラットに2984mg/kg投与した場合にみられた。このようにこの化合物の毒性は極めて低い。

本発明の化合物が生体内で或いは治療目的で使用される場合、これは生物学的に相合性のあるも

性であれ動物性のものであれ、本発明薬剤を含む組成物が種々の慣用的な方法で食品に適用される。治療目的に使用される場合、治療される動物は本発明の製剤組成物の一定量が投与される。投与は例えば毎日行われ、本発明の薬剤或いは化合物の有効量は動物体重1kgあたり25mgまでであってよい。典型的な調整物は、例えば皮膚に塗布する軟膏或いはローションである場合、薬剤或いは組成物を10%まで含むものである。もとよりこの量はある程度変動させてもよく、示唆した量は、本発明の最良の実施形態を開始する出願人の義務を果たしたに過ぎない。

#### 本発明の効果

本発明の背景にかかわる先行説明から明らかのように、本発明組成物及び方法は、動物性及び植物性物質におけるキーとなる標的蛋白質の老化を抑制し、その結果として経済的及び医学的利益をもたらす。食品の場合、本組成物の投与により食品劣化を遅延させ、それにより、食品の寿命を延ばし消費者に大きな便益を与えることができる。

今日使用されている保存剤、例えば人間に対しアレルギーやぜん息を生じさせる二酸化イオウに代えて、この、非毒性で生物学的に相合性のある化合物を使用することによる、本発明の二次的な効果が見出される。

本発明の治療意図は、老化プロセスの抑制にあり、老化プロセスは先に述べたように二次グリコシル化及び交叉結合によるキーとなる蛋白質の老化にあることがわかっている。かくして身体蛋白質、例えばコラーゲン、コラスチン、レンズ蛋白質、神経蛋白質及び腎臓系球基底質膜などのすべてが、本発明の実施により長命化及び作用的な好影響を受けるのである。また本発明は、標的蛋白質が交叉結合することによる蛋白質の蓄集にかかわる病理学的事態、例えばアテロース性動脈硬化症、関節節症、関節周囲硬直症、皮膚の弾性減退及び収縮、関節硬化、糸球体腎炎等を減じさせる。これらすべての症状は、糖尿病患者の別の症状である。かくして本発明は、老令の患者或いは上記病理学的症状に悩む患者の治療に関係する。

カウントの $^{14}\text{C}$ -グルコース、を含んでいた。この放射線ラベルグルコースは使用前にあらかじめ活弁化して、アルブミンと反応して初期グリコシル化産物生成の程度を誤って表示するような雑物を除去するようにした。反応混合物を $37^\circ\text{C}$ で培養してサンプルを、0.5、1.0、1.5、及び2週間後に採取した。比較のための混合物は、グルコース或いは薬剤を欠くものであった。

培養期間後、サンプルを以下のように処理した。すべての未結合グルコースを除去するための透析後、存在する蛋白質の量を標準的な染料結合アッセイ法により測定した。アルブミンに結合されるようになったグルコースの量、即ち初期グリコシル化産物の測定は、アルブミンをトリクロロ酢酸と共に沈澱させ、シンチレーションカウント法により結合グルコースの放射線を測定することにより決定した。二次グリコシル化最終産物の量は、製出願である米国特許第590,820号に記載された先述のPongorほかにより説明されているアルブミンの蛍光を測定することにより決定した。動起

本発明は以下の、生体及び試験等による本発明薬剤にいくつかの選択、及び試験の実験的な例を研究することにより、更によく理解されるであろう。

#### 実施例

##### 例1

試験管内における二次グリコシル化最終産物の生成を抑制する本発明薬剤のいくつかの効果を測定するため、アルブミン及びグルコースを共に2週間、いくつかの試験薬剤の存在下で培養した。分析のため、サンプルを規則的な間隔をおいて採取した。二次グリコシル化最終産物を、蛍光化合物の出現として測定し、初期グリコシル化産物は、放射線ラベルグルコースをアルブミンに結合することによって測定した。反応条件は以下の通りである。夫々の混合物は6 $\mu\text{g}$ / $\mu\text{l}$ ウシ血清アルブミン、200 $\mu\text{M}$ グルコース、200 $\mu\text{M}$ 試験薬剤（塩酸アミノグアニジン、 $\alpha$ -ヒドラジノヒスチジン、或いはリシンのいずれか）、及び0.5Mりん酸塩緩衝液、pH7.6に溶かした1分あたりほぼ $9.5 \times 10^6$

及び発光最大値のスペクトル測定はすべてのサンプルについて行われ、これらの値が抑制剤との付加物生成の結果としてシフトしたものでないことを確認した。

この実験の結果は第1図に示されている。夫々のサンプルについて、放射線ラベルグルコースの結合は、棒枠の黒塗部で示され、蛍光は棒枠の白抜部で示されている。すべての値はアルブミン1ミリグラムあたりの値で表示される。以後の説明において、アミノグアニジンは塩酸塩誘導体の形である。この実験結果は、グルコースとアルブミンが反応して、0.5、1、1.5及び2週間の培養（グルコース+BSA）後、大量の蛍光性の二次グリコシル化最終産物が生成されることを示している。200 $\mu\text{M}$ のアミノグアニジンを含めることにより、2週間培養（BSA+グルコース+I#2）後の比較サンプルと比較すると、8倍も蛍光化合物の生成が劇的に減少した。200 $\mu\text{M}$ の $\alpha$ -ヒドラジノヒスチジンをふくめることによっても蛍光（BSA+グルコース+I#1）で測定して、二



次グリコシル化最終産物の生成が減少した。リジンは、蛍光性化合物生成(BSA+グルコース+リジン)の減少を生じさせるように見えるが、次の実験からわかるように、蛋白質交叉を減少させる能力をもっていた。初期グリコシル化最終産物の量は、グルコース結合によって測定すると、すべての反応で殆んど変らなかった。グルコースなしの比較培養では、蛍光産物(A)は殆んど進展しないことを示した。

これらの結果は、アミノグアニジン、そしてより小さい範囲で $\alpha$ -ヒドラジノヒスチジンが、グルコースとアルブミンが時間を越えて反応した場合蛍光化合物の減少させること、を示しており、また、これら二種の薬剤は二次グリコシル化最終産物の量を減少させることを示している。これら薬剤は、初期グリコシル化産物の生成を変えるわけではない。

## 例II

蛋白質交叉結合抑制に及ぼす薬剤の効果をより正確に測定するために、不溶解蛋白質に対する溶

液、或いはリジンを200mMの濃度で加えた。ウシ血清アルブミンは放射線をラベルし、ビーズに結合するようになる量が測定できるようにした。ビーズに結合される放射線ラベル量は蛋白質補集の直接的な測定となる。

37℃で反応混合物を2週間培養後、ビーズをチャオトロピック剤(chotropic agent)でよく洗い、共有結合した放射性物を測定した。その結果は第2図に示されている。

一番左の棒枠は、グリコース-6-フォスフェートを使用せず、また試験薬剤を使用せずに(比較用コラーゲン)、ビーズに結合された放射性ラベル物の比較レベルを示す。二番目の棒枠はグルコース-6-フォスフェート(NEG、コラーゲン)の存在下で高い値の結合があったことを示す。このことは、糖尿病及びその余病を有する患者の血液中のグルコースが高い濃度で存在する状態と似ている。図は、アミノグアニジン(NEG コラーゲン+I #1)もしくは $\alpha$ -ヒドラジノヒスチジン(NEG コラーゲン+1 #1)の存在下

解蛋白質の試験管内結合の程度を測定するアッセイ法が考案された。このアッセイ法は、血清蛋白質が血管外液質中の蛋白質に結合して蛋白質を蓄積し、いくつかの他の組織の血管腔を狭めるような、体組織内で生じる事態を模倣したものである。生体内のこのような事態は腎臓病やアテローム性動脈硬化症を生ぜしめ、糖尿病や老化にかかわる病理学的症状を生起させる。

蛋白質の補集(即ち結合或いは蓄積)を測定するため、ゼラチン(コラーゲン)を慣用の方法により活性寒天ビーズ(アフィゲル10号、バイオラッド ラボラトリーズ社製)に結合した。結合後、ビーズの残る活性位置のすべてはグリシンエチルエステルとの反応によりふさがれた。

グルコースよりも急速に蛋白質と共に初期グリコシル化産物を生成するグルコースのより反応的な形である400Mのグルコース-6-フォスフェートと、ウシ血清アルブミンを2週間ビーズと共に培養した。いくつかの実験では更に試験薬剤であるアミノグアニジン、 $\alpha$ -ヒドラジノヒスチジ

の蛋白質補集量が大幅に減少したことを示す。リジンはまた蛋白質補集量をアミノグアニジンの場合(図示せず)と同程度に減少させた。この実験結果は、補集を減少させる生体内のこれら化合物、或いは膜その他の組織に対する溶解蛋白質の蓄積的な価値を示し、またこれら薬剤は糖尿病及び老化の病理学的症状を減少させる価値があることを示している。

## 例III

蛋白質補集、交叉結合及び二次グリコシル化最終産物生成の抑制のモデルとしての、化合物アミノグアニジンをより深く評価するため、子ウシ皮膚コラーゲンを使用した以下の実験を行った。コラーゲンは、皮膚のしなやかさに関与する皮膚中の蛋白質であり、交叉結合は収縮、弾性の減少、蛋白質劣化に対する感受性減少、その他の変化を誘導する。

子ウシ皮膚サンプルからコラーゲンを酢酸中に抽出し、次に0.6M塩化ナトリウムを用いて沈澱させた。これらの手順において、既に永久的に交

又結合しているか或いは変質している皮膚コラーゲン溶液を除いた。天然コラーゲンフィブリルを0.02 Mりん酸塩緩衝液による透析により再構成し、140 mMの存在下に、また200 mMアミノグアニジンを用いて或いは用いずに3週間、35℃で培養した。培養後、サンプルを透析し交叉結合の程度を二種の方法で決定した。第一の方法では、100℃で2%のナトリウムドデシルスルフェートで処理することにより溶解しうる反応コラーゲンの量が測定された。

第3A図に示すように、グルコース及びアミノグアニジンと共に培養したコラーゲンは、緩衝液中でのみ培養したコラーゲンと同様に溶解性がある。これと対照的に、アミノグアニジンなしのグルコース中で培養したコラーゲンは50%のみが溶解した。このことは更に、皮膚その他の組織中で老化と関係のある変化の防止のために、アミノグアニジンが有用性をもつかもしいことを示すものである。

反応コラーゲンは、緩衝液中で臭化シアノーゲン

処理することによりこのコラーゲンを破砕状にした後、更に検査された。得られた蛋白質断片は、ナトリウムドデシルスルフェートポリアクリルアミドゲル電気泳動により寸法別に分けられた。電気泳動後、これら蛋白質断片は銀染色法を用いてゲル中で固定された。ゲルは第3B図に示されている。

レーン(帯)bは、グルコースのみで培養されたコラーゲンを含む。多数の高分子断片がゲル頂部に凝集域を生成し、高分子断片の大きな域を示していることが注目される。この材料のいくつかはゲルに入ることができず、勾配ゲル上の30%位置にゲル中に存在する。レーン(帯)cはグルコース及びアミノグアニジンと共に培養したコラーゲンを含むものであり、レーンの上部に大量の高分子断片がないことが注目される。なぜなら蛋白質断片のすべてがゲル下部によく分離しているからである。レーンaはPBSのみで培養したコラーゲンを示す。この一番左のレーンaは、一連の分子重量マーカーである。同様の結果は、電

気泳動緩衝液中で二硫硫酸結合還元剤の存在下であるいは存在なしに観察された。

上記データは、アミノグアニジンが、コラーゲンがグルコースと共に培養された時に生ずる還元剤の量を減少されることを示しており、また、この薬剤が典型的な例として皮膚に塗布された時に、弾力性の喪失及び収縮を含む年齢に關係する変化の防止に有用性があることを示唆している。

上述の試験管実験はすべて、グルコースの存在のもとで培養された蛋白質から試験管内で生成する二次グリコシル化最終産物の生成を抑制する薬剤としての、アミノグアニジンの価値を示す。グルコースは体内に存在し糖尿病の場合には蓄的に増大するため、また体内における蛋白質は、二次グリコシル化最終産物を示す交叉結合と蛍光化合物の生成を示すことが知られているため、生体内における薬剤の使用には、糖尿病と老化過程で生ずる変化に關わる病理学的症状の防止に有用であるかもしれない。

従って以下の実験は、本発明の上記仮説を生体

内的環境で試験するために行われた。

#### 例IV

生体内における二次グリコシル化最終産物のレベルを測定するため、ラットの腎臓について、糸球体基質膜に結合する血清蛋白質を検査した。これは、このプロセスを研究するためには良好なモデルである。何故なら、腎臓中の脈管外マトリックス中の過剰なプラズマ蛋白質形成の結果としての未治療糖尿病の場合に、著しい腎臓病理学的症状があらわれることが知られているからである。

この実験は、正常なラット及び糖尿病ラットの双方に、16週間にわたり、体重1 kgあたり25mgの塩酸アミノグアニジン薬剤を毎日腹腔内投与することにより行った。このアミノグアニジンの塩酸塩は、純然たるアミノグアニジンよりも溶解性がありまたより苦痛をもたらさないために使用された。糖尿病には、ストレプトゾトシンを一回投与することにより製剤治療前に罹患するようにした。比較ラットに対しては、糖尿病ラットにも正常ラットにも薬剤が投与されなかった。

薬剤治療終了時に、ラットは屠殺され腎臓がとり出された。夫々の器官がカプセルからとり出され、臓質が除かれた。主として系球体を含む組織の残り部分はドライアイスで凍結され、 $-70^{\circ}\text{C}$ で保蔵された。夫々の治療群毎に5匹のラットから得た組織を処理のため組み合わせた。

系球体基質膜を調整するため組織をスライス状に切断し、一連のふるい (170、100及び270) を通過させて、記載されているように (Bersswenger, P. J., 及び Spiro, R. G., による DIABETES, 22巻, 180-193ページ, 1973年)、系球体を細管その他の望ましくない組織成分から分離した。系球体純度は80-90%であることがわかった。この最終的な材料を集め、15分間1500rpmで遠心分離して系球体をベレット化し、 $-70^{\circ}\text{C}$ で凍結した。

解凍分離した系球体を、ブランソンソニファイヤー 200型細胞破壊器を用いて、超音波処理中1分間の休止期間において、氷上で4回の1分間隔で、破壊した。試料を位相差顕微鏡を用いて観察し、系球体のすべてが破壊されていることを確

認した。系球体基質膜を10分間、3000rpmの遠心分離によりベレット化し、1Mの塩化ナトリウムで、次いで蒸留水で洗浄した。精製系球体基質膜の残余ベレットを凍結し、凍結乾燥した。薬剤を用いて或いは用いずに治療した後の、正常ラット及び糖尿病ラットの系球体基質膜に結合した血清免疫グロブリンG (IgG) の量を測定するため、酵素免疫アッセイ法を使用した。IgGの測定のため、凍結系球体基質膜組織の6mgサンプルを0.5 mMの0.05 M炭酸塩緩衝液、pH 7.6、中で懸濁し、アルカリフォスファターゼ (ダイナテック社製) に共役結合したラット抗-IgG抗体の1:5,000希釈液の0.5 mMを加えた。この混合物を一晩ポリスチレン管中で培養した。前記ポリスチレン管は、りん酸塩緩衝食塩水 (PBS) 中に溶かした3%ヤギ血清と0.05%トウィーン20中で2時間培養し、PBSとトウィーンとで2回の洗浄を行うことにより、あらかじめブロックされていた。

系球体基質膜に交叉結合されるIgGに抗体が結

合するようにするための、一晩の培養後、膜は5分間3200rpmの遠心分離によりベレット化し、非結合抗体-酵素共役物なしに、PBSトウィーンを用いた4回のすすぎ洗い及び蒸留水を用いた3回のすすぎ洗いをした。抗体-酵素共役残余結合分の量を測定するため、0.5 mMの基質溶液 (10%ジエタノールアミン、pH 9.8に1mg/mlのパラ-ニトロフェニルフォスフェートを溶かした溶液を含む) を添加し、室温で30分間培養を行った。反応は、0.2mlの水酸化ナトリウムを添加することにより停止し、400nmにおける吸収が測定された。

第4図は、この実験の結果を示す。図からわかるように、糖尿病ラットは系球体基質膜に結合されたIgGを高レベルで有し (棒棒D)、正常ラットはその値の1/5である (N)。塩酸アミノグアニジンを毎日投与された糖尿病ラットは、正常ラットにおけるIgGと同様の低いレベルを示した (D+I)。薬剤を投与された正常ラットは同様の低いレベルであった (N+I)。

これらの実験はアミノグアニジンが、ラットの系球体基質膜におけるこのプラスマ蛋白質の補集及び蓄積を防ぐ働きをしていることを示している。おそらくこの病理症状を有する腎臓、眼、動脈壁その他の組織についても、この蛋白質及びその他の血清蛋白質の補集は同様に減ずるであろう。動脈壁にリポ蛋白質が補集されることは、アテローム性動脈硬化症を導くものであることは、よく知られていることである。

これら生体内実験は、試験管内実験に加え、この種の薬剤治療法が、蛋白質の二次グリコシル化及び蛋白質と他の巨大分子との間の交叉結合の生成と関連する病理症状の減少に有効であることを更に証言だてるものである。この薬剤治療は、腎疾患、高血圧病及び血管外疾患を含む動脈疾患、腱、靱帯その他関節部損傷などの余病を併発させる老令化及び糖尿病において生ずる蛋白質の補集増加及び交叉結合を防止するために役立つ。この薬剤治療はまた、アテローム性動脈硬化症、また糖尿病及び老令化と共に生ずる連続的な組織変化を遅

れさせることができる。局所的、経口的、非経口的投与法により、局所的或いは組織的な治療を行うことが考えられる。

本発明は、その精神及び必須の特徴を失うことなく他の形態或いは他の方法で実施することができる。本発明の開示は従ってすべての点で説明のためになされたものであって本発明の範囲を限定するものでなく、均等の意味及び範囲内における変動は本発明の範囲に包含される、と理解されるべきである。

#### 4. 図面の簡単な説明

第1図は、試験管内実験をスペースとする、ある量のグルコースと反応したアルブミンの二次グリコシル化最終産物の生成を抑制するための研究結果を示す図。

第2図は、コラーゲンなどのグリコシル化した構造の蛋白質による、蛋白質補集及び蓄積を抑制するための研究結果を示す図。

第3A図は、本発明の薬剤を用いて、或いは用いることなく、グルコースと共に培養したコラー

ゲンの溶解度を示す図；

第3B図は、本発明の薬剤を用いて、或いは用いることなく、グルコースと共に培養したコラーゲンの臭化シアノゲン処理後の蛋白質断片の分離を示すポリアクリルアミドゲルの写真図；

第4図は、本発明薬剤が投与された糖尿病ラットの糸球体基質膜に結合する蛋白質の程度を検査した生体内研究の結果を示す図である。

特許出願人

ザ ロックフェラー

ユニバーシティ

代理人

早 川 政 名

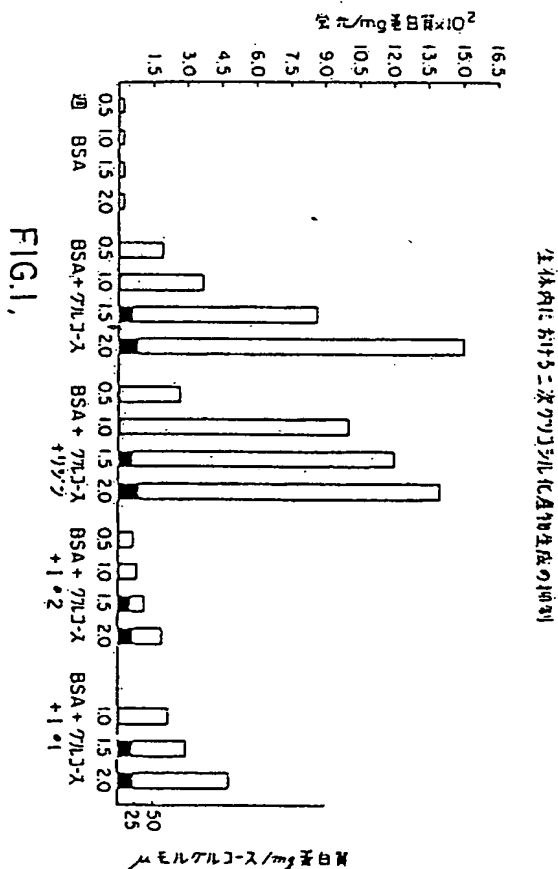
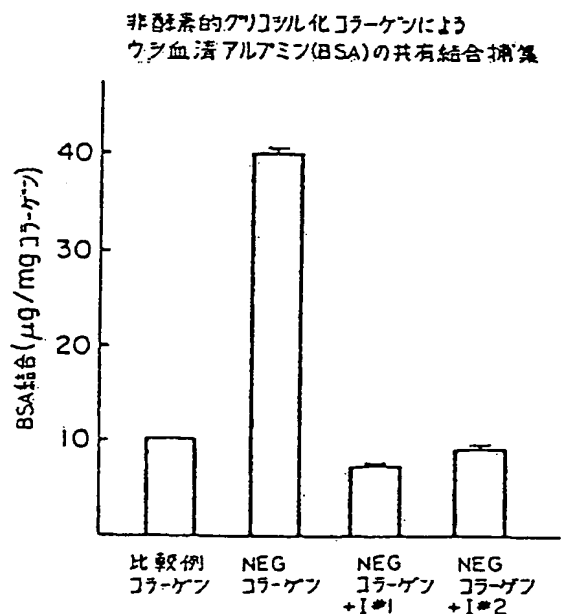


FIG.2



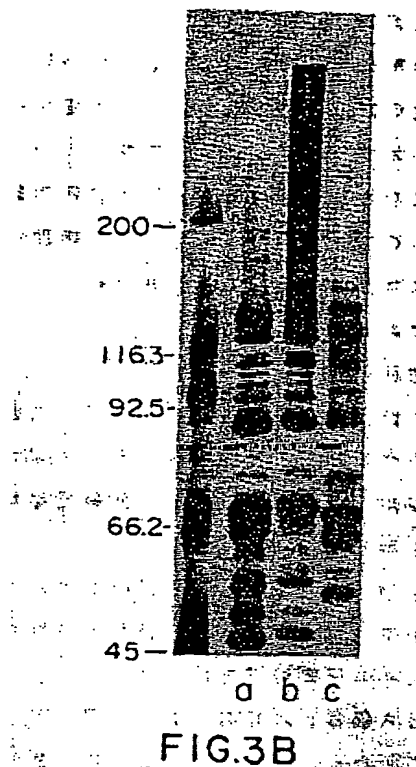
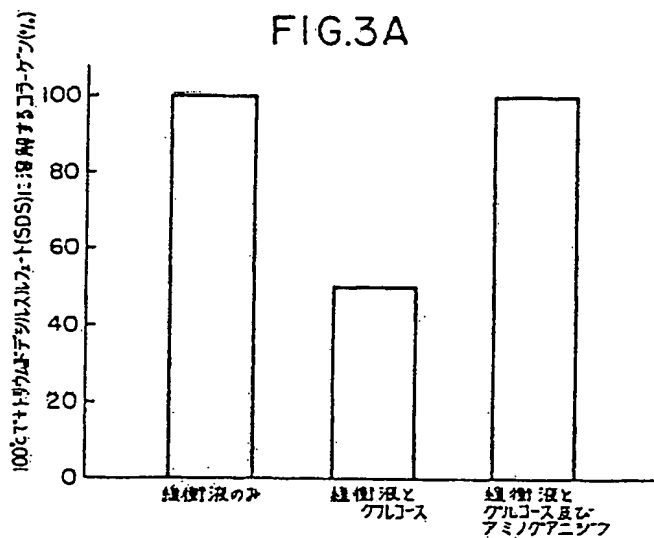
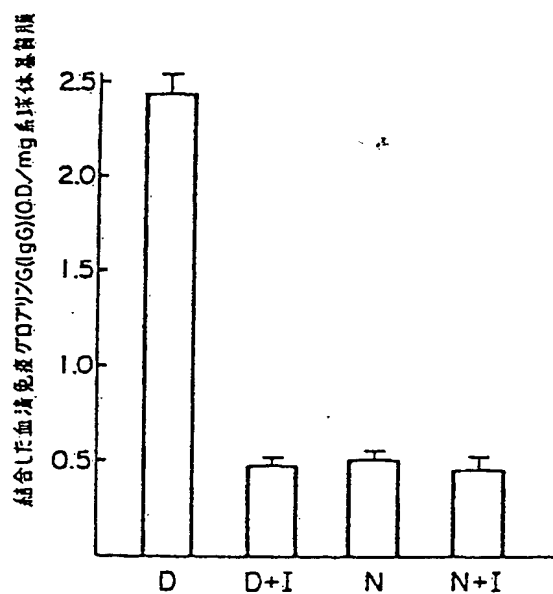


FIG.4

生体内における二次アリコシル化産物の抑制



第1頁の続き

⑤Int.Cl.<sup>4</sup>

A 61 K 31/195  
31/415

// C 07 C 101/24  
109/06  
133/10

識別記号

A B U  
A C V

庁内整理番号

7330-4C